



日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED

FEB 27 2002

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第146358号

出 願 人

Applicant(s):

三井化学株式会社

2000年 6月 2日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦

出証番号 出証特2000-3041996

【書類名】 特許願

【整理番号】 31990029

【提出日】 平成11年 5月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/10

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中野区中野 1 - 2 3 - 1

 【氏名】 加藤 美砂子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区南久が原 1 - 5 - 1 5

 【氏名】 芦原 担

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県稲敷郡茎崎町高見原 1 - 5 - 4 6 - 2 0 3

 【氏名】 水野 幸一

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 - 2 - 2

 【氏名】 藤村 達人

【特許出願人】

 【識別番号】 000005887

 【氏名又は名称】 三井化学株式会社

 【代表者】 佐藤 彰夫

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005278

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 カフェインシンターゼおよび該酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と 1 5 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を含み、かつカフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】 ポリペプチドが配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含むカフェインシンターゼである請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 2 に記載のヌクレオチド配列で規定される DNA を含有する請求項 3 に記載の DNA。

【請求項 5】 配列番号 2 に記載のヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 3 ～ 5 のいずれか一項に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 7】 微生物および／または植物の細胞内で、カフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドを発現させることができる請求項 6 記載のベクター。

【請求項 8】 請求項 6 または 7 に記載のベクターで形質転換された微生物。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換された微生物を用いて、カフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドを製造する方法。

【請求項 1 0】 請求項 6 または 7 に記載のベクターで形質転換された植物細胞、植物組織または植物体。

【請求項 1 1】 請求項 1 0 に記載の形質転換植物、該植物の培養細胞または植物を用いて植物二次代謝産物を製造する方法。

【請求項 1 2】 植物二次代謝産物が、キサントシン、7-メチルキサントシン、7-メチルキサンチン、テオブロミン、テオフィリン、カフェインから選

ばれる少なくとも1つ以上の化合物である請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 形質転換植物がツバキ (Camellia) 属植物、コーヒー (Coffea) 属植物、がコラノキ (Cola) 属植物、コカノキ (Erythroxylum) 属植物、モチノキ (Ilex) 属植物、ネエア (Neea) 属植物、アオギリ (Firmiana) 属植物、ポーリニア (Paullinia) 属植物又はカカオノキ (Theobroma) 属植物である請求項 12 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カフェインシンターゼ、該酵素をコードする DNA、該 DNA で形質転換された微生物および植物、ならびに該植物またはその培養細胞または組織を用いて、カフェインまたはその前駆体を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

カフェインは、チャ (Camellia sinensis) などのツバキ科ツバキ属植物やコーヒー (Coffea arabica) 等のアカネ科コーヒー属植物等に含まれるプリンアルカロイドで、医薬品原料や食品添加物として使用されている。現在のところ、カフェインは前記植物種を始めとするカフェイン産生植物からの抽出、または有機合成によって製造されている。また、チャやコーヒーなどの嗜好品においては、それらの刺激性を緩和または又は増強するために、古典的な育種手法等を用いてカフェインおよびその中間体の含有量の低減または増加が試みられている。

【0003】

カフェインは、キサントシンから3段階のN-メチル化を経て生合成されることが¹⁴C-トレーサー実験により明らかにされている(図1)。[Phytochemistry, 31, 2575- (1992)]。このメチル化を触媒する酵素活性は、1975年にチャ葉の粗抽出液を用いた研究で最初に報告された[Biochem.J., 146, 87- (1975)]。コーヒーでメチルトランスフェラーゼの精製が試みられているが[Phytochemistry, 37, 1577- (1994)]、精製倍率はきわめて低い。チャでは、メチルトランスフェラーゼの部分精製の報告はあるが[Physiol.Plant., 98, 629- (1996)]、

酵素タンパク質は単離されていない。

【0 0 0 4】

以上のように、カフェインシンターゼ、即ち、カフェイン生合成の最終反応である 7-メチルキサンチン→テオブロミン→カフェインの 2 段階のメチル化反応を触媒する N-メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列及びそのアミノ酸配列をコードする DNA に関しては、これまでのところ全く知られていなかった。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、カフェインシンターゼをコードする DNA の全部もしくは一部を微生物または植物細胞にセンスまたはアンチセンスの形で組み込むことにより、以下の目的を達成しようとするものである。

(1) 工業用、食品用または医療用酵素として利用できるカフェインシンターゼを効率よく生産する。

(2) カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物を効率よく生産する。

(3) カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物群の生成比を改変する。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究の結果、チャの幼葉からカフェインシンターゼの酵素タンパク質を単離精製することに成功した。そのタンパク質の N 末端アミノ酸配列結果を基に DNA プローブを作成し、このプローブを用いて RT-PCR 法および 5' RACE 法により目的 DNA を単離することに成功した。次にこの DNA をベクターに組み込んだ後大腸菌に導入し、当該 DNA に由来するタンパク質を大量に発現させた。このタンパク質の酵素学的性質を調べたところ、チャの幼葉から単離したカフェインシンターゼと同一の反応、すなわちパラキサンチンからのカフェインの生成が認められ、当該 DNA がカフェインシンターゼをコードする遺伝子であることを確認した。本発明者らは、カフェイン産生植物の一つであるチャからカフェインシンターゼならびにその遺伝子を単離したが、S-アデ

ノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体としてキサントシン類化合物やキサンチン類化合物にN-メチル化を行う植物であれば、本発明に記載のカフェインシンターゼと実質的に同一の酵素およびDNAが含まれていると推測され、本発明に記載の方法を用いれば、それらの植物からでも、本発明に記載のカフェインシンターゼと実質的に同一の酵素およびDNAを単離することができる。

本発明者らは以上の知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0007】

則ち本発明は以下のとおりである。

〔1〕 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と15%以上の相同性を示すアミノ酸配列を含み、かつカフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチド。

〔2〕 上記〔1〕記載のポリペプチドをコードするDNA。

〔3〕 配列番号2に記載のヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

〔4〕 上記〔2〕又は〔3〕に記載のDNAを含むベクター。

〔5〕 上記〔4〕に記載のベクターで形質転換された微生物。

〔6〕 上記〔5〕に記載の形質転換微生物を用いて、カフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドを製造する方法。

〔7〕 上記〔4〕に記載のベクターで形質転換された植物細胞、植物組織または植物体。

〔8〕 上記〔7〕に記載の形質転換植物、該植物の培養細胞または植物を用いて植物二次代謝産物を製造する方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明においてチャの幼葉から単離されたカフェインシンターゼは、配列番号1に示したアミノ酸配列を有しているが、本発明にかかるカフェインシンターゼは、それ自身が実質的にチャ幼葉のカフェインシンターゼと同等の機能を有する限り、必ずしも高い相同性を有している必要はない。ここで「高い相同性」とは

、それぞれのカフェインシンターゼ遺伝子がコードするアミノ酸の比較において 15%以上の相同性、好ましくは30%以上の相同性、好ましくは45%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。一般に同等の機能を有する複数の酵素間において、酵素活性に必須である部位以外のアミノ酸配列の相同性は非常に低いことがあることは良く知られている [Kawagoe et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, 12082-(1996)]。

【0009】

また、塩基配列に関しても、それら自身が実質的にチャ幼葉のカフェインシンターゼと同等の機能を有する酵素タンパク質をコードする限り、配列番号2に記載の塩基配列と必ずしも高い相同性を有している必要はない。ここで「高い相同性」とは、それぞれのカフェインシンターゼ遺伝子がコードする核酸の比較において45%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。

【0010】

この種の実質的にチャ幼葉由来のカフェインシンターゼと同様の機能を有する酵素タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAの全部もしくは一部とハイブリダイズ [J.Mol.Biol., 98, 503-(1975)、Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] し、実質的に当該カフェインシンターゼの機能を有する酵素をコードするDNAをあげることができる。ここで、「配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAの全部もしくは一部」とは、カフェインシンターゼ遺伝子を構成するDNAの少なくとも14以上のヌクレオチド配列をいう。ハイブリダイゼーションの方法としては、具体的には、例えばGene Imageシステム（アマシャム）を利用することが可能で、製品プロトコルに従って、目的植物のcDNAライブラリーを転写したメンブレンを、標識したプローブとプロトコル指定のハイブリダイゼーションバッファー中で例えば55℃で一晩インキュベーションした後、50℃で6×SSC、0.1%SDS溶液で洗浄し、ハイブリダイゼーションしたDNAを

選択することができる。

【0011】

あるいはまたカフェインシンターゼタンパク質を構成するアミノ酸配列をコードするDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR技術[植物のPCR実験プロトコル(細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ2)秀潤社(1995)]を利用して、他の植物からカフェインシンターゼタンパク質と実質的に同一なタンパク質をコードするカフェインシンターゼ遺伝子を単離することも可能である。具体的には、mRNAから合成したcDNAにリンカーを結合させ、カフェインタンパク質を構成するアミノ酸配列をコードするDNAとリンカー間でPCRを行うこと等により、目的cDNAの全長配列を単離することができる。

【0012】

ハイブリダイゼーション技術やPCR技術により得られるカフェインシンターゼと実質的に同一な遺伝子は、少なくとも単離に使用した部位においては、配列番号2に記載のカフェインシンターゼ遺伝子と高い相同性を有する。ここで高い相同性とは、それぞれのカフェインシンターゼ遺伝子がコードするアミノ酸配列の比較において15%以上の相同性、好ましくは30%以上の相同性、45%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。ただし、得られるカフェインシンターゼ遺伝子によっては、コードするアミノ酸の複数の残基が欠失、付加、置換された結果として、カフェインシンターゼとの相同性が15%以下となってもなお、カフェインシンターゼの機能に必須な領域を保持し、実質的にカフェインシンターゼと同等の機能を有するタンパク質をコードしていることも想定される。

【0013】

このようなカフェインシンターゼ遺伝子を単離するために用いる生物としては、カフェインまたはその前駆体を産生する生物であればすべて使用できるが、中でもチャなどのツバキ科ツバキ(Camellia)属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー(Coffea)属植物、コラノキなどのアオギリ科コラノキ(Cola)属植物な

どを例示することができる。

【0014】

これらカフェインシンターゼ遺伝子を植物細胞内で発現させるためには、(i) 植物細胞内で転写可能なプロモーター、(ii) プロモーターの下流にセンス方向またはアンチセンス方向に連結したカフェインシンターゼ遺伝子DNAの全部または一部、(iii) 必要に応じて該遺伝子DNAの下流に連結された転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列、を含む発現カセットを植物細胞に導入する。

【0015】

ここで、「カフェインシンターゼ遺伝子DNAの全部または一部」とは、実質的にカフェインシンターゼ遺伝子と同等の機能を有するDNAの単位をいう。このような発現カセット、及びこれを含むベクターも本発明の対象である。

発現カセットは、挿入されているDNAを恒常的または誘導的に発現させるためのプロモーターを含有し得る。恒常的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、イネのアクチンプロモーターなどが挙げられる。また、誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば糸状菌、細菌、ウイルスの感染や侵入、低温、高温、乾燥、嫌気的条件、特定の化合物の散布等の外因によって発現することが知られているプロモーター等が挙げられる。このようなプロモーターとしては、例えば、糸状菌、細菌、ウイルスの感染や侵入によって発現するイネのキチナーゼ遺伝子のプロモーターやタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーター、低温によって誘導されるイネの「lip19」遺伝子のプロモーター、高温によって誘導されるシロイヌナズナの「HSP18.2」遺伝子のプロモーター、乾燥によって誘導されるイネの「rab」遺伝子のプロモーター、嫌気的条件下で誘導されるトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター等が挙げられる。またイネのキチナーゼ遺伝子のプロモーターとタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーターはサリチル酸等の特定の化合物によって、イネの「rab」遺伝子プロモーターは植物ホルモンのアブシジン酸の散布によっても誘導される。

【0016】

或いはまた、発現カセットに挿入されているDNAを発現させるためのプロモーターとしては、カフェインシンターゼ遺伝子のプロモーターを単離して利用する方法も挙げられる。具体的なプロモーターの単離方法の一例には、カフェインシンターゼ遺伝子、例えばカフェインシンターゼ遺伝子のDNAの全部又は一部をプローブとしたハイブリダイゼーション技術の利用により、ゲノムDNA断片を選択し、該遺伝子の上流部DNAを特定する方法を挙げることができる。

【0017】

組み換えDNA分子の植物への導入に備えるために、大腸菌の複製シグナル及び形質転換された細菌の細胞を選抜するためのマーカー遺伝子を含むクローニングベクターが数多く利用できる。このようなベクターの例には、pBR322、pUC系、M13mp系等がある。適当な制限酵素切断部位で、目的の配列をベクターに導入することができる。得られたプラスミドDNAの特徴を明らかにするため、制限酵素切断部位分析、ゲル電気泳動、及びその他の生化学的・分子生物学的方法が一般に用いられる。各々の操作を終えた後、プラスミドDNAを切断して、別のDNAに結合させることができる。各プラスミドDNAの配列を、同じプラスミド又は別のプラスミド中にクローニングすることができる。

【0018】

植物宿主細胞の中に発現カセットを導入するためには、さまざまな手法を用いることができる。これらの手法には、形質転換因子としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) または、アグロバクテリウムリゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) を用いたT-DNAによる植物細胞の形質転換、プロトプラストへの直接導入（インジェクション法、エレクトロポレーション法等）、パーティクルガン法等やその他の可能性が含まれる。

【0019】

プロトプラストへの直接導入では、特別に必要とされるベクターはない。例えば、pUC誘導体のような単純なプラスミドを用いることができる。目的の遺伝子を植物細胞に導入する方法によっては、他のDNA配列が必要になることもある。例えばTiまたはRiプラスミドを植物細胞の形質転換に用いる場合には、TiおよびRiプラスミドのT-DNA領域の少なくとも右端の配列、大抵は両

端の配列を、導入されるべき遺伝子の隣接領域となるように接続しなければならない。

【 0 0 2 0 】

アグロバクテリウム属菌を形質転換に用いる場合には、導入すべき発現カセットを、特別のプラスミド、すなわち中間ベクターまたはバイナリーベクター中にクローニングする必要がある。中間ベクターはアグロバクテリウム属菌の中では複製されない。中間ベクターは、ヘルパープラスミドあるいはエレクトロポレーションによってアグロバクテリウム属菌の中に移行される。中間ベクターは、T-DNAの配列と相同な領域をもつため、相同組換えによって、アグロバクテリウム属菌のTiまたはRiプラスミド中に取り込まれる。宿主として使われるアグロバクテリウム属菌には、vir領域が含まれている必要がある。通常TiまたはRiプラスミドにvir領域が含まれており、その働きにより、T-DNAを植物細胞に移行させることができる。

【 0 0 2 1 】

一方、バイナリーベクターはアグロバクテリウム属菌の中で複製、維持され得るので、ヘルパープラスミドあるいはエレクトロポレーション法によってアグロバクテリウム属菌中に取り込まれると、宿主のvir領域の働きによって、バイナリーベクター上のT-DNAを植物細胞に移行させることができる。

【 0 0 2 2 】

なお、このようにして得られた発現カセットを含む中間ベクターまたはバイナリーベクター、及びこれを含む大腸菌やアグロバクテリウム属菌等の微生物も本発明の対象である。

【 0 0 2 3 】

形質転換された植物細胞は、再生過程を経ることにより植物体に変換することができる。再生の方法は植物細胞の種類により異なるが、例えばイネではFujimuraら [Plant Tissue Culture Lett., 2, 74- (1995)] の方法、トウモロコシでは、Shillitoら [Bio/Technology, 7, 581- (1989)] の方法、シロイヌナズナではAkamaらの方法 [Plant Cell Rep., 12, 7- (1992)] などが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

これらの方法により作出された植物体またはその繁殖媒体（例えば種子、塊茎、切穂など）から得た植物体は、カフェインまたはその前駆体を産生する野生型の植物体と比較して本発明のカフェインシンターゼタンパク質の発現量が増加し、ホスト植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物の生成量の変化や、ホスト植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物群の生成比の変化が起こる。このようにして得られたトランスジェニック植物は本発明の対象である。

【0025】

前記のSAMをメチル基供与体としてカフェインを生成する植物としては、チャなどのツバキ科ツバキ (Camellia) 属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー (Coffea) 属植物、コラノキなどのアオギリ科コラノキ (Cola) 属植物など、カフェイン産生植物を例示することができる。

【0026】

本発明にかかるカフェインシンターゼをコードするDNAを導入してカフェインシンターゼタンパク質を大量に発現させるための微生物としては、大腸菌や枯草菌等の細菌及びバキュロウイルス等のウイルスを例示することができる。

【0027】

また、ホスト細胞の代謝を改変して特定化合物の生産性向上や特定の化合物群の生成比改変を図ることを目的に、本発明にかかるカフェインシンターゼをコードするDNAをセンスまたはアンチセンスの形で組み込む植物としては、カフェインまたはその前駆体を産生する植物であればすべて使用できるが、中でもチャなどのツバキ科ツバキ (Camellia) 属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー (Coffea) 属植物、コラノキなどのアオギリ科コラノキ (Cola) 属植物などを例示することができる。

【0028】

さらに、本発明にかかるカフェインシンターゼは、テオブロミンの他にも7-メチルキサンチンといった構造類似化合物もメチル化することができるので、前記の植物種以外であってもこれらキサントシンやキサンチンの構造類似化合物を含む植物であれば、本発明の方法を適用することができる。

【0029】

なお、酵素学的な検討の結果、本発明にかかるカフェインシンターゼは以下の基本的性質を有することが明らかになっている。

分子量：41,000 (SDS-PAGE)、61,000 (ゲルろ過)

等電点：4.5～5.0 (クロマトフォーカシング)

至適 pH：8.5

K_m値：21 μM (SAM)、24 μM (パラキサンチン)

阻害剤：SAH

反応機構：SAM + パラキサンチン → SAH + カフェイン

【0030】

【実施例】

以下、実施例および比較例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】 カフェインシンターゼ精製画分の調製

1997年5月に鹿児島県枕崎市で採種した、チャ葉 (*Camellia sinensis* var. Yabukita) の第1、2、3葉を液体窒素を用いて凍結し、-80℃で保存した。この材料100gを、1,000mlの5mM EDTA-Na₂、5mM 2-メルカプトエタノール、5% (v/v) グリセリン、1mg アプロチニン、0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム、2.5% (w/v) 不溶性ポリビニルポリピロリドンを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) を加えて磨碎し、3層のガーゼで濾過した後に濾液を遠心分離 (10,000g、15分) して上清を得た。この上清に対して50-80% 飽和硫酸分画を調製した。この分画を Sephadex G-25 を用いて脱塩し、2mM EDTA-Na₂、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解させた後に、同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (15×160mm) に吸着させ、200ml 2mM EDTA-Na₂、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む10-200mM リン酸ナトリウム緩衝液の直線濃度勾配を用いて活性画分を溶出した。活性画分を集め、80% 飽和硫酸処理により沈殿を回収し、2mM EDTA-Na₂、

2 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM KCl、20% (v/v) グリセリンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.4) に溶解した。脱塩処理を行った後に、同じ緩衝液で平衡化した高速液体クロマトグラフィー専用の陰イオン交換カラム Shodex IEC QA-824 (8×25 mm) に吸着させた。同じ緩衝液でカラムを洗浄後、36 ml の20-750 mM KCl (2 mM EDTA-Na₂、2 mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解) の直線濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。活性画分を集め、脱塩処理を行い、2 mM EDTA-Na₂、2 mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した後、同じ緩衝液で平衡化したアフィニティーカラムであるアデノシン-アガロース (1 ml) に吸着させた。0.2 M NaCl、2 mM EDTA-Na₂、2 mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で活性画分を溶出した。得られた画分を2 mM 2-メルカプトエタノール、150 mM KCl、20% (v/v) グリセリンを含む50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化したHi Load Superdex 200 (16×600 mm) を用いてゲル濾過を行い、最終精製標品を得た。表1にカフェインシンターゼの精製過程における比活性の変化をまとめた。

【0031】

【表 1】

ステップ	画分	液量 ml	総活性 pkat	総タンパク量 mg	比活性 pkat mg-1	精製度 fold	産生量 %
1.	Crude extract	930	6330	581	10.9	1.0	100
2.	Ammonium sulfate	33.8	3410	155	22.0	2.0	3.9
3.	Hydroxyapatite	23.0	2630	28.9	91.0	3.0	41.5
4.	Shodex IEC QA-824	7.5	1070	4.82	221	20.3	16.9
5.	Adenosine-agarose	2.0	202	0.08	2530	232	3.2
6.	Superdex 200	5.8	228	0.04	5700	523	3.6

【0032】

【実施例 2】 カフェインシンターゼ精製画分のアミノ末端アミノ酸配列の解析
最終精製標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、セミドライプロ

ッティング装置を用いP V D Fメンブレンに転写した。カフェインシンターゼが転写された部位を切り取り、A B I プロテインシーケンサーを用いてN末端のアミノ酸配列を分析した。その結果を配列番号3に示す。

【0033】

〔実施例3〕 カフェインシンターゼのc D N Aクローニングのためのオリゴヌクレオチド

N末端の7アミノ酸残基に基づく19残基のオリゴヌクレオチドNMT-1とN o t I - (d T) 18プライマー（ファルマシアバイオテック）をプローブとした。配列番号4にNMT-1の配列を示す。

【0034】

〔実施例4〕 カフェインシンターゼのクローニングのための1本鎖c D N Aの合成

(1) t o t a l RNAの単離

5 gの若いチャ葉を液体窒素存在下で乳棒、乳鉢を用いて破碎した。液体窒素の昇華後、50 mlの3M L i C l、8M 尿素を加えて、ポリトロンでさらに破碎した。4℃で一晩静置した後、12,000 r p mで15分間、遠心分離を行った。沈殿を0.5% S D S、10mM T r i s - 塩酸緩衝液（pH 7.6）に懸濁し、総量で10 ml程度にした。10 mlのフェノール/クロロホルム溶液を加えて混合し、12,000 r p m、10分間の遠心分離を行った。上清に1/10倍容の3M 酢酸ナトリウム溶液（pH 4.8）を加え、さらに2倍容のエタノールを加えて-80℃で1時間静置した。4℃、12,000 r p m、10分間の遠心分離を行い、上清を除去した沈殿に70% エタノールを加えて懸濁し、再度、遠心分離を行った。上清を除去し、真空ポンプでドライアップした。沈殿を1.5 mlの水に溶かし、150 μlの3M 酢酸ナトリウム溶液（pH 4.8）を加え、さらに1.5 mlのフェノール/クロロホルム溶液を加えて転倒混和し、12,000 r p m、10分間の遠心分離を行った。上清に2倍容のエタノールを加え、-80℃で20分間静置した後、4℃で12,000 r p m、10分間の遠心分離を行い得られた沈殿に70% エタノールを加えて、再度、遠心分離を行った。沈殿を1.5 mlの水に溶かし、150 μl

の3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.8) を加え、さらに1.5 ml のフェノール/クロロホルム溶液を加えて転倒混和し、12,000 rpm、10分間の遠心分離を行った。上清に2倍容のエタノールを加え、-80℃で20分間静置した後、4℃で12,000 rpm、10分間の遠心分離を行い得られた沈殿に70% エタノールを加えて、再度、遠心分離を行った。真空ポンプでドライアップした後、200 μ l の水に溶解し、total RNA の画分とした。

【0035】

(2) mRNA の単離

上述の方法で得た total RNA (2 mg) に65℃、5分間の熱処理を行った後、等量の2倍濃度A液 (10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mM Na₂-EDTA、0.1% SDS、0.5 M NaCl) と混合した。0.1 g の oligo (dT) -Cellulose Type 7 (ファルマシア) を2 ml のB液 (10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mM Na₂-EDTA、0.1% SDS、0.1 M NaCl) 中で膨潤させ、その懸濁液を先端にガラスウールをつめたブルーチップに注ぎ、2.5 ml の0.1 N NaOH で洗浄した後、5 ml のA液を流して平衡化した。このカラムに total RNA をアプライし、3 ml のA液、4 ml のB液を流した後に、mRNA を3 ml のC液 (10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mM Na₂-EDTA、0.05% SDS) で溶出した。溶出液をエタノール沈殿によって濃縮し、ドライアップした後水に溶解し、-80℃で保存した。

【0036】

(3) 1本鎖cDNAの合成

190 ng のmRNA を65℃、10分間の熱処理を行った後、ただちに氷上で3分間急冷した。このサンプルをテンプレートにして、First-Strand cDNA Synthesis Kit (ファルマシア) を用いて1本鎖cDNA を合成した。合成したcDNA は-20℃で保存した。

【0037】

[実施例5] RT-PCR法によるカフェインシンターゼのクローニング

先に述べた方法で調製した1本鎖cDNAをテンプレートにした以下の反応液を調製した。この反応液をPeltier Thermal cycler PTC-200（フナコシ）を用いて、95℃/1分の反応後、95℃/1分、45℃/1分、72℃/2分を30サイクル反応させる条件でPCRを行い、反応生成物を得た。

テンプレートcDNA	3 μ l
10 \times buffer	5 μ l
2.5mM NTP	8 μ l
NMT-1	1 μ l (50 pmol)
NotI-(dT)18	1 μ l (50 pmol)
H ₂ O	31 μ l
ExTaq (TAKARA)	1 μ l

【0038】

[実施例6] プラスミドベクターへのサブクロニング

0.8% アガロースゲルを用いてTAE中で反応生成物の電気泳動を行い、得られた目的生成物のバンドを切り取り、GENE CLEAN（フナコシ）を用いてゲルからDNAを回収した。回収したDNAをpT7blueベクター（Novagen）にライゲーションした後、大腸菌DH5 α にトランスフォーメーションした。X-galを用いてカラーセレクションを行った後に、アンピシリンを含むLB培地で液体培養を行い、アルカリーSDS法によりプラスミドを抽出した。インサートの有無はアガロース電気泳動によって確認した。

【0039】

[実施例7] 塩基配列の決定

単離したプラスミドを用いて下記の反応液中でプライマーエクステンションを行った。反応条件は96℃/1分間反応させた後、96℃/0.2分間、50℃/0.1分間、60℃/4分間を25サイクル行った。反応液に対してエタノール沈殿を行い、得られたDNAをTemplate suppression reagentに溶解し、ABI-310ジェネティックアナライザーを用い

て分析した。目的DNAの中央部分の配列を決定するためには、DNAをS t y Iで処理して得られたDNAフラグメントをpUC19にサブクローニングしたプラスミドを用いた。配列番号5、6にそれらのプライマー配列を示す。

プライマーエクステンション反応液

プラスミドDNA (20 ng)	2 μ l
P r e m i x	4 μ l
P r i m e r	1 μ l
H ₂ O	3 μ l

【0040】

〔実施例8〕 5' RACE法によるカフェインシンターゼmRNAの5' 上流域の単離

5' 上流域の単離には、5' - F u l l R A C E C o r e S e t (T A K A R A)を用いた。配列番号7~16に使用したプライマーの配列を示す。

実施例4に記した方法で合成した1 s t s t r a n d c D N Aについて、h y b r i d R N Aの分解、ライゲーション反応による1本鎖cDNAの環化の後に、配列番号7~11、または配列番号12~16のプライマーを用いて、常法に基づいてPCR反応を行い、反応生成物を得た。アクリルアミド電気泳動により反応生成物のバンドを分離し、ゲルからDNAを回収し、p T 7 b l u e ベクターにサブクローニングした。その後、実施例6と7と同様の方法でインサートされたDNAの塩基配列を決定した。

【0041】

〔実施例9〕 カフェインシンターゼの大腸菌での発現

単離したカフェインシンターゼ遺伝子を発現ベクターp E T 2 3 d (N o v a g e n)に組み込み直すために以下の操作を行なった。

単離したカフェインシンターゼを挿入したp T 7 b l u e ベクターをテンプレートとして、配列番号17及び18に記載のプライマーを用いて以下の条件でP

CRを行い反応生成物を得た。則ち、反応条件は、95℃/1.5分間の後、95℃/1分間、52℃/1分間、72℃/1分間を30サイクル行った。

カフェインシンターゼをNcoIとEcoRIで処理して得られた断片を挿入したpET23dベクターのNcoIサイトに、上記PCR産物をさらに挿入しカフェインシンターゼ発現プラスミドを構築した。このプラスミドを大腸菌BL21(DE3)にトランスフォーメーションした。得られた大腸菌を37℃で2時間培養した後に、IPTGを最終濃度0.3mMになるように加え、30℃でさらに3時間培養を行った。培養終了後集菌し、3mlの培養液の菌体に対し0.2mlの10mM Tris-塩酸緩衝液(pH7.5)、0.1M NaCl、1mM EDTA-Na₂中で1分間断続的に超音波破碎を行った。これを14,000rpm、10分間の遠心分離を行い、得られた上清を酵素液とした。

カフェインシンターゼ活性測定のための反応液は、100mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.5)、0.2mM MgCl₂、0.2mM パラキサンチン、4μM [メチル-¹⁴C] S-アデノシルメチオニン(0.9kBq)に酵素液10μlを加えたものとし、反応液の体積は100μlとした。27℃で10分間の反応を行い、得られた¹⁴C-カフェインを1mlのクロロホルムを加えて抽出し、クロロホルム層の放射活性を測定した。対照としては、反応液からパラキサンチンを除いたものを用いた。活性測定の結果、1.56pmolのカフェインが生成したことが判明した。

【0042】

【発明の効果】

本発明によれば、工業用、食品用または医療用酵素として利用できるカフェインシンターゼを効率よく生産する事が可能になる。

本発明によれば、カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物を効率よく生産する事が可能になる。

本発明によれば、カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物群の生成比を改変することが可

能になる。

【0 0 4 3】

【配列表】

【0 0 4 4】

配列番号：1

配列の長さ：3 5 6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

起源

生物名：チャ (Camellia sinensis)

配列：

Phe	Met	Asn	Arg	Gly	Glu	Gly	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ala	Gln	Asn	Ser	Ser
1				5				10					15		
Phe	Thr	Gln	Gln	Val	Ala	Ser	Met	Ala	Gln	Pro	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala
				20				25					30		
Val	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Asp	Phe	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Ala
				35				40					45		
Ala	Asp	Leu	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Phe	Ala	Val	Ile	Ser
				50				55					60		
Thr	Ile	Lys	Arg	Met	Met	Glu	Lys	Lys	Cys	Arg	Glu	Leu	Asn	Cys	Gln
				65				70					75		80
Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Tyr	Leu	Asn	Asp	Leu	Phe	Gly	Asn	Asp	Phe
				85				90					95		
Asn	Thr	Leu	Phe	Lys	Gly	Leu	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Gly	Asn	Lys	Cys
				100				105					110		
Glu	Glu	Val	Pro	Cys	Tyr	Val	Met	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Phe	His	Gly
				115				120					125		
Arg	Leu	Phe	Pro	Arg	Asn	Ser	Leu	His	Leu	Val	His	Ser	Ser	Tyr	Ser

130	135	140
Val His Trp Leu Thr Gln Ala Pro Lys Gly Leu Thr Ser Arg Glu Gly		
145	150	155
Leu Ala Leu Asn Lys Gly Lys Ile Tyr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Pro		160
	165	170
Val Val Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Gln Phe His Glu Asp Phe Thr Met		175
	180	185
Phe Leu Asn Ala Arg Ser Gln Glu Val Val Pro Asn Gly Cys Met Val		190
	195	200
Leu Ile Leu Arg Gly Arg Gln Cys Ser Asp Pro Ser Asp Met Gln Ser		205
	210	215
Cys Phe Thr Trp Glu Leu Leu Ala Met Ala Ile Ala Glu Leu Val Ser		220
225	230	235
Gln Gly Leu Ile Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Phe Asn Ile Pro Ser		240
	245	250
Tyr Phe Ala Ser Leu Glu Glu Val Lys Asp Ile Val Glu Arg Asp Gly		255
	260	265
Ser Phe Thr Ile Asp His Ile Glu Gly Phe Asp Leu Asp Ser Val Glu		270
	275	280
Met Gln Glu Asn Asp Lys Trp Val Arg Gly Glu Lys Phe Thr Lys Val		285
	290	295
Val Arg Ala Phe Thr Glu Pro Ile Ile Ser Asn Gln Phe Gly Pro Glu		300
305	310	315
Ile Met Asp Lys Leu Tyr Asp Lys Phe Thr His Ile Val Val Ser Asp		320
	325	330
Leu Glu Ala Lys Leu Pro Lys Thr Thr Ser Ile Ile Leu Val Leu Ser		335
	340	345
Lys Ile Asp Gly		350
	355	

【 0 0 4 5 】

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 4 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源

生物名 : チャ (Camellia sinensis)

配列 :

TGATATCACT GCTGTGGCAG CTGGCCTCTT TGCTATAAAA ATTACTTTTC TGACGAGGCA	60
TGGAGCTAGC TACTGCGGGG AAGGTGAACG AAGTGTGTGTT CATGAACAGG GGGGAAGGAG	120
AAAGTAGTTA TGCACAAAAC TCTTCTTTCA CGCAACAAGT GGCCTCAATG GCACAGCCAG	180
CGCTAGAAAA TGCAGTTGAA ACTCTCTTCT CCAGAGATTT CCACCTTCAA GCTCTTAACG	240
CAGCGGACTT GGGTTGTGCA GCGGGTCCAA ACACATTTCG AGTGATTCTT ACGATCAAGA	300
GAATGATGGA AAAGAAATGC AGGGAATTGA ATTGCCAAAC ACTGGAAGTT CAGGTTTACT	360
TGAATGATCT TTTTGAAAT GATTTCATA CCCTCTTCAA AGGCCTGTCG TCTGAGGTTA	420
TTGGTAACAA ATGTGAGGAA GTTCCGTGTT ATGTGATGGG AGTACCGGGG TCTTTCCATG	480
GCCGGCTTTT TCCTCGTAAC AGCTTACATT TAGTTCATTC CTCTTACAGT GTTCATTGGC	540
TTACTCAGGC ACCAAAAGGA CTCACAAGCA GAGAAGGCTT GGCATTAAAC AAGGGGAAGA	600
TTTACATATC AAAGACAAGC CCTCCTGTTG TAAGAGAAGC CTACTTATCT CAATTTTCATG	660
AAGATTTTAC AATGTTTCTC AATGCTAGAT CCCAAGAGGT GGTTCCAAAT GGTGTATGG	720
TGTTGATACT TCGTGGTAGG CAATGTTCTG ATCCTTCAGA CATGCAGAGC TGCTTTACTT	780
GGGAAGTATT AGCTATGGCC ATTGCTGAAT TGGTTTCACA GGGATTGATA GATGAAGATA	840
AATTAGACAC CTTCAATATA CCCAGCTATT TTGCATCACT TGAGGAAGTG AAAGATATAG	900
TGGAGAGGGA CGGATCATTC ACAATTGATC ATATAGAGGG GTTTGATCTT GATAGCGTAG	960
AAATGCAGGA GAATGATAAA TGGGTTAGAG GGGAAAAGTT TACCAAGGTT GTCAGGGCCT	1020
TCACAGAGCC TATAATTTCA AACCAGTTTG GACCTGAAAT CATGGACAAA CTATATGACA	1080
AATTCATCA CATTGTAGTT TCAGATTGAG AAGCAAAGCT ACCGAAGACC ACAAGTATCA	1140

TCCTAGTGCT TTCCAAGATT GATGGATAGT TTTT TAGTGT TGTGAAATAA ACTGTTGTCC 1200
 CTATCACATA TATGCCACTA GAGGGTTGTG CCAATGTATT GCACAAGAAG ATTTGAGAGG 1260
 GGTCAAATAT AGAAAGCATT TTGCTCTTGT GTGGAGAGAG AATGTTTTCT TGATTTAAAT 1320
 CTGTGATACC CAAATCGTAA TGTGGAAG AAATGAGAAG TTGAACATGA AATTTTAAAA 1380
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAATT CCTGCGGCCG CGAATTC 1427

【 0 0 4 6 】

配列番号 : 3

配列の長さ : 2 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ポリペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

起源

生物名 : チャ (Camellia sinensis)

配列 :

Phe Met Asn Arg Gly Glu Xaa Glu Ser Ser Tyr Ala Gln Asn Ser Gln

5

10

15

Phe Thr Gln Val

20

【 0 0 4 7 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 :

ハイボセティカル配列 : y e s

起源

生物名 :

配列：

TTYATGAAYM GIGGIGARG

19

【 0 0 4 8 】

配列番号： 5

配列の長さ： 1 9

配列の型： 核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： E

起源

生物名：

配列：

CAAAAGGGTC AGTGCTGCA

19

【 0 0 4 9 】

配列番号： 6

配列の長さ： 1 7

配列の型： 核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： E

起源

生物名：

配列：

ATGACCATGA TTACGCC

17

【 0 0 5 0 】

配列番号： 7

配列の長さ： 2 0

配列の型： 核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

GCCGGTACCT TTCTGGGGCC

20

【 0 0 5 1 】

配列番号：8

配列の長さ：2 2

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

CCGCTGCGTT AAGAGCTTGA AG

22

【 0 0 5 2 】

配列番号：9

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

GCCAAACACT GGAAC TTCAG G

21

【 0 0 5 3 】

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : E

起源

生物名 :

配列 :

CCATTGAGGC CACTTGTTGC GTG

23

【 0 0 5 4 】

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : E

起源

生物名 :

配列 :

GGCCTGTCGT CTGAGGTTAT TG

22

【 0 0 5 5 】

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : E

起源

生物名：

配列：

CAGCAATGGC CATAGCTAAT AG

22

【 0 0 5 6 】

配列番号： 1 3

配列の長さ： 2 2

配列の型：核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： E

起源

生物名：

配列：

CCGCTGCGTT AAGAGCTTGA AG

22

【 0 0 5 7 】

配列番号： 1 4

配列の長さ： 2 1

配列の型：核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： E

起源

生物名：

配列：

GCCAAACACT GGAAC TTCAG G

21

【 0 0 5 8 】

配列番号： 1 5

配列の長さ： 2 3

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

CCATTGAGGC CACTTGTTGC GTG

23

【0 0 5 9】

配列番号：1 6

配列の長さ：2 2

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

GGCCTGTCGT CTGAGGTTAT TG

22

【0 0 6 0】

配列番号：1 7

配列の長さ：1 7

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：E

起源

生物名：

配列：

GCCATGGTTT ACGCGCA

17

【 0 0 6 1 】

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : E

起源

生物名 :

配列 :

CGGCCATGGA AAGACCCCGG

20

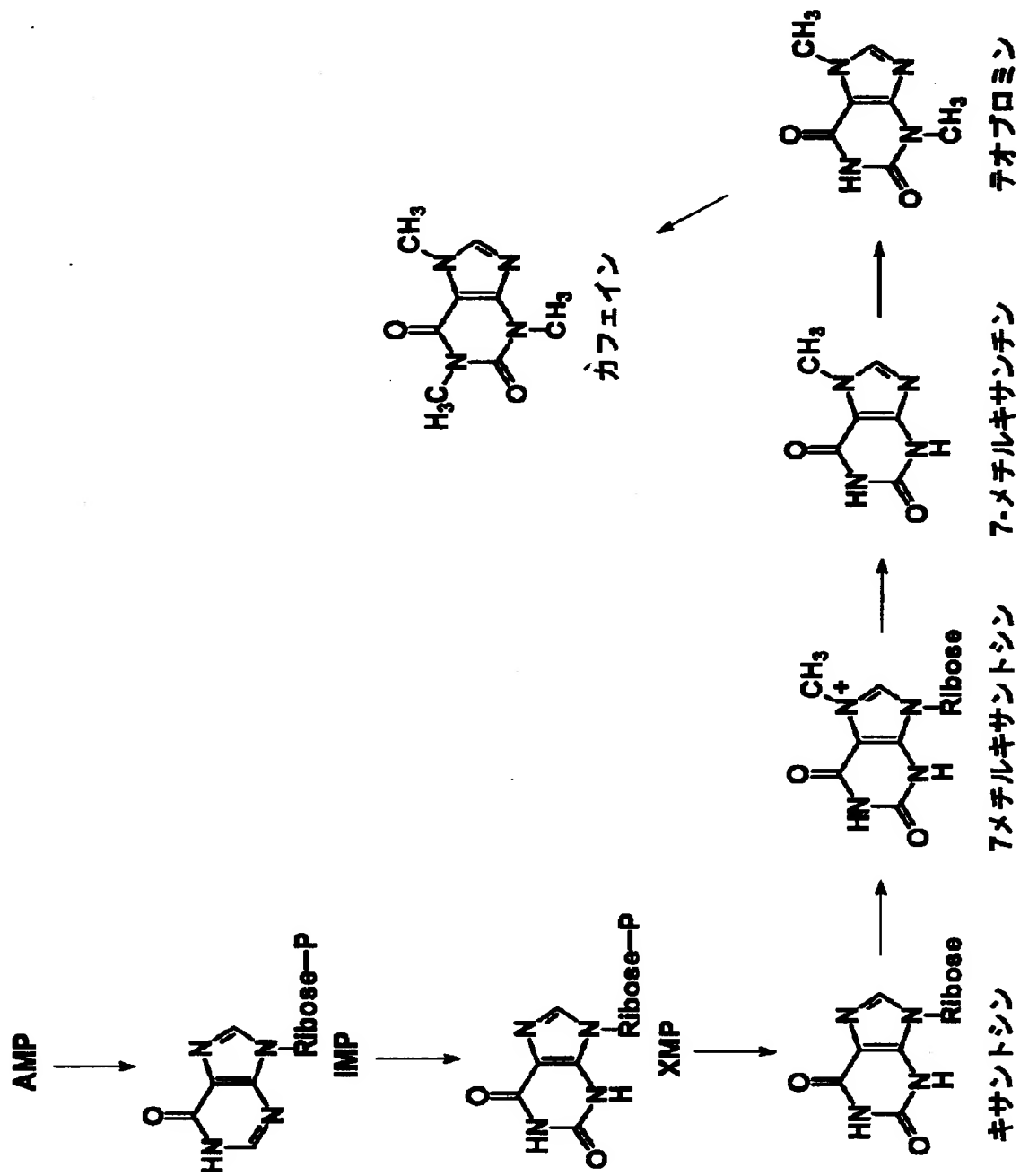
【図面の簡単な説明】

【図 1】 カフェイン生合成経路を示す図である。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、カフェインシンターゼをコードするDNAの全部もしくは一部を微生物または植物細胞にセンスまたはアンチセンスの形で組み込むことにより、①工業用、食品用または医療用酵素として利用できるカフェインシンターゼを効率よく生産する。②カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物を効率よく生産する。③カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物群の生成比を改変する。等の課題を達成する。

【解決手段】 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と 1 5 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、カフェインシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含むベクターで形質転換された微生物または植物体または培養細胞を用いてカフェインシンターゼを生産する。

【効果】 本発明方法は、植物中のカフェイン含有量を変化させ得る。またカフェインシンターゼを生産できる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年 6月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第146358号

【補正をする者】

【識別番号】 000005887

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関三丁目 2 番 5 号

【氏名又は名称】 三井化学株式会社

【代表者】 佐藤 彰夫

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1

【その他】 表 1 において、ステップ 2 の生産量が「3. 9」となっているのは誤記であり、正しくは「5 3. 9」であります。又、ステップ 3 の精製度が「3. 0」となっているのは「8. 0」の誤記であります。いずれの場合も、その他の数値から計算によって導かれるものでありますから、誤記であることは明らかであり、本補正はなんら新規事項を加入するものではありません。

【プルーフの要否】 要

【0031】

表1

ステップ	画分	液量	総活性	総タンパク量	比活性	精製度	産生量
		ml	pkat	mg	pkat mg-1	fold	%
1.	Crude extract	930	6330	581	10.9	1.0	100
2.	Ammonium sulfate	33.8	3410	155	22.0	2.0	53.9
3.	Hydroxyapatite	23.0	2630	28.9	91.0	8.0	41.5
4.	Shodex IEC QA-824	7.5	1070	4.82	221	20.3	16.9
5.	Adenosine-agarose	2.0	202	0.08	2530	232	3.2
6.	Superdex 200	5.8	228	0.04	5700	523	3.6

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年 6月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第146358号

【補正をする者】

【識別番号】 000005887

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関三丁目 2 番 5 号

【氏名又は名称】 三井化学株式会社

【代表者】 佐藤 彰夫

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中野区中野 1 - 2 3 - 1

【氏名】 加藤 美砂子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区南久が原 1 - 5 - 1 5

【氏名】 芦原 坦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡茎崎町高見原 1 - 5 - 4 6 - 2 0 3

【氏名】 水野 幸一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 - 2 - 2

【氏名】 藤村 達人

【その他】 発明者中、「芦原 坦」とあるのは、本来「芦原 坦」とすべきところを書き損じたことによる誤記であります

特平 1 1 - 1 4 6 3 5 8

。よってここに訂正致します。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005887]

1. 変更年月日	1997年10月 1日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
氏 名	三井化学株式会社